

بررسی همزمان میزان نیتريت و نیترات باقی مانده در فرآورده‌های گوشتی عرضه شده در شیراز با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

حجت اله گلکاری^۱، محمدهادی اسکندری^{۲*}، سارا پاک فطرت^۳، حنان لشکری^۴

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد داراب، مربی گروه علوم و صنایع غذایی، داراب، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زرین دشت، مربی گروه علوم و صنایع غذایی، زرین دشت، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: eskandar@shirazu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۱/۶/۴ پذیرش نهایی: ۹۱/۱۰/۱۱)

چکیده

نیترات و نیتريت از کلیدی‌ترین افزودنی‌ها در تولید فرآورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده محسوب می‌شوند. به رغم مزایای تکنولوژیکی نیتريت، ایجاد مواد سرطان‌زای نیتروزآمین نگرانی‌هایی را در مورد استفاده از این افزودنی به همراه داشته است. در این پژوهش از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای ارزیابی همزمان میزان نیتريت و نیترات باقی مانده در فرآورده‌های گوشتی حاوی ۸۰-۶۱ درصد گوشت عرضه شده در روز چهارم پس از تولید در شهر شیراز استفاده شد. میزان متوسط نیتريت و نیترات باقی مانده در نمونه‌های سوسیس به ترتیب $7/38 \pm 36/96$ و $5/5 \pm 85/81$ و در نمونه‌های کالباس به ترتیب $3/28 \pm 20/97$ و $5/3 \pm 124/85$ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. میزان نیترات و نیتريت در نمونه‌های سوسیس و کالباس تفاوت معنی‌داری ($p < 0/05$) نشان داد. میزان باقیمانده نیتريت در تمامی نمونه‌ها کمتر از حداکثر میزان مجاز ۱۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. این یافته نشان‌دهنده به کارگیری مقادیر مجاز نیتريت در این فرآورده‌ها می‌باشد. با وجود این که نیترات به طور معمول به این قبیل فرآورده‌های گوشتی اضافه نمی‌شود، اما در تمامی نمونه‌ها مقادیر قابل توجهی نیترات مشاهده شد. منشأ نیترات ردیابی شده را می‌توان به نیترات موجود در مواد اولیه نظیر گوشت، آب، ادویه و سبزیجات و همچنین تبدیل یون نیتريت به نیترات در ابتدای فرآوری مرتبط دانست. نتایج مطالعه نشان داد، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا روشی سریع و دقیق برای اندازه‌گیری همزمان میزان نیتريت و نیترات باقیمانده در فرآورده‌های گوشتی امولسیونه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نیتريت، نیترات، باقی مانده، فرآورده‌های گوشتی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مقدمه

عمل‌آوری گوشت شامل استفاده از نمک، شکر، نیتريت و یا نیترات در گوشت برای پدید آمدن یک سری ویژگی‌های مطلوب در آن می‌باشد. از بین این ترکیبات، نیتريت و نیترات از نقش کلیدی‌تری برخوردارند و عمده ویژگی‌های مطلوب گوشت‌های عمل‌آوری شده به آنها مربوط می‌شود. نیترات بیشتر در محصولات طیور که زمان عمل‌آوری طولانی‌تری دارند یا دوره رسیدگی را پشت سر می‌گذارند استفاده می‌شود، چون این ماده به مرور زمان به نیتريت احیا می‌شود (Forest, 1985).

نیتريت یک ماده بسیار واکنش‌گر است که می‌تواند در واکنش‌های شیمیایی متعددی شرکت کند. از نقطه نظر بهداشتی، عملکرد ضد بوتولینی نیتريت در جلوگیری از رشد و تولید سم باکتری کسترییدیوم بوتولینوم از اهمیت زیادی برخوردار است. به علاوه نیتريت یک آنتی‌اکسیدان بسیار خوب است و از اکسید شدن چربی‌های فرآورده‌های گوشتی در طول نگهداری آنها جلوگیری می‌کند (Pegg and Shahidi, 2000). علی‌رغم تمام ویژگی‌های مطلوب ذکر شده برای نیتريت، این ماده می‌تواند در شرایط خاص با آمین‌ها و اسیدهای آمینه آزاد موجود در فرآورده‌های گوشتی واکنش دهد و نیتروز آمین‌ها را تولید کند (Honikel, 2008). سرطان‌زایی و جهش‌زایی نیتروز آمین‌ها در بسیاری از حیوانات به اثبات رسیده است و از این رو در خصوص تولید این ماده در فرآورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده نگرانی‌های زیادی وجود دارد (Huang et al., 1996). پژوهش‌ها نشان داده است که مقدار نیتروز آمین تولیدی در فرآورده‌های گوشتی به میزان نیتريت افزوده شده و

هچنین نیتريت باقی مانده در محصول بستگی دارد (Pegg and Shahidi, 2000).

نیتريت افزوده شده با پروتئین‌ها، چربی‌ها، رنگدانه‌ها و دیگر اجزای گوشت واکنش می‌دهد و تنها مقداری از آن به شکل یون آزاد در محصول باقی می‌ماند. نیتريتی که در واکنش شرکت نمی‌کند را نیتريت باقی مانده می‌گویند. از این رو با توجه به نگرانی‌هایی که در مورد نیتريت باقی مانده در فرآورده‌های گوشتی وجود دارد، تلاش‌های زیادی برای کاهش یا حذف نیتريت در فرمولاسیون‌های گوشتی صورت پذیرفته اما هنوز جایگزین مناسبی که بتواند نقش‌های نیتريت را در فرآورده‌های عمل‌آوری شده انجام دهد شناخته نشده است. با توجه به خواص تکنولوژیک نیتريت، برخی از تولیدکنندگان ممکن است از مقادیر بیش از حد مجاز آن در فرآورده‌های گوشتی برای مقاصد خاص استفاده کنند (Pegg and Shahidi, 2006). از ابتدای دهه ۱۹۷۰ میلادی، در بسیاری از کشورهای دنیا قوانین و مقرراتی برای محدود کردن میزان استفاده از نیتريت و نیترات در فرآورده‌های گوشتی وضع شده است. در ایران حداکثر میزان مجاز افزودن نیتريت سدیم در فرآورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده امولسیونه (سوسیس و کالباس) 120 mg/kg در نظر گرفته شده است اما در مورد میزان مجاز نیترات افزودنی به این فرآورده‌ها صحبتی نشده است (ISIRI, No: 2303). نیتريت یک ماده واکنش‌گر است و بلافاصله پس از افزودن آن به فرمولاسیون درگیر واکنش‌های شیمیایی می‌شود. از طرفی فرآیندهای حرارتی سبب کاهش قابل قبول نیتريت آزاد می‌شود. از این رو مطابق استاندارد ایران حداکثر میزان قابل قبول نیتريت باقی مانده در فرآورده‌های گوشتی عمل‌آوری

نیتريت و نیترات با روش متداول اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شده است. بسیاری از گزارش‌های منتشر شده درباره میزان نیتريت و نیترات فرآورده‌های گوشتی در جهان، اطلاعات مربوط به چند سال متمادی و یا حتی چندین دهه ارزیابی این افزودنی‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به چنین گزارش‌هایی می‌توان به روند استفاده از این افزودنی‌ها در منطقه مورد مطالعه پی برد. در مقایسه با دیگر کشورها اطلاعات منتشر شده پیرامون میزان این افزودنی‌ها در فرآورده‌های گوشتی ایران محدود و تمامی آنها مطالعات مقطعی می‌باشد. یکی از اهداف این پژوهش استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای ارزیابی همزمان میزان نیتريت و نیترات در فرآورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده می‌باشد، به علاوه در این بررسی، میزان نیتريت و نیترات سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در سطح بازار مصرف مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج چنین بررسی‌هایی می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های کلان در زمینه کنترل بهداشتی مواد غذایی نقش داشته باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک بررسی مقطعی بوده و جامعه آماری شامل سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در سطح شهرستان شیراز در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۰ می‌باشد. تعداد ۲۰ نمونه سوسیس و ۲۰ نمونه کالباس از نشان‌های مختلف تجاری (تولید شده در نقاط مختلف ایران) که بیشترین میزان مصرف را در میان مردم داشتند جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در شرایط مناسب به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۵ درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش‌ها

شده حاوی ۶۱ تا ۸۰ درصد گوشت، چهار روز پس از تولید و نگهداری در یخچال، ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عنوان شده است.

روش متداول در اندازه‌گیری نیتريت و نیترات بر طبق استاندارد ایران (ISIRI, No: 2303) و همچنین در بسیاری از کشورها یک روش رنگ سنجی و با استفاده از اسپکتروفوتومتر می‌باشد.

این روش به ویژه در مورد ارزیابی میزان نیترات روشی وقت‌گیر محسوب می‌شود. به علاوه فاکتورهای متعددی می‌توانند در این آزمون‌ها تداخل ایجاد کنند و دقت آنها را تحت تاثیر قرار دهند (Ferreira and Silva, 2008; Rincon et al., 2003). در سال‌های اخیر پژوهشگران زیادی برای ارزیابی میزان نیتريت و نیترات در مواد غذایی از روش‌های اندازه‌گیری بر پایه کروماتوگرافی استفاده کرده‌اند. استفاده از روش‌های کروماتوگرافی پیشرفته در مقایسه با روش کلاسیک اندازه‌گیری نیتريت و نیترات مزایایی دارد. این روش‌ها سریع، حساس و اختصاصی بوده و نتایج دقیق و قابل اعتمادی را تولید می‌کند (Ferreira and Silva, 2008; Oztekin et al., 2002). از این رو اندازه‌گیری همزمان نیتريت و نیترات در فرآورده‌های گوشتی با روشی سریع و دقیق از اهمیت بالایی برخوردار است.

با توجه به اهمیت میزان نیتريت باقی‌مانده در فرآورده‌های گوشتی، در سال‌های گذشته بررسی‌های زیادی جهت اندازه‌گیری آن در ایران صورت گرفته است (Nasehinia et al., 2008; Kamkar et al., 2004a; Kamkar et al., 2004b).

اما تنها یک گزارش از اندازه‌گیری میزان نیترات در این فرآورده‌ها در دست می‌باشد (Babaei et al., 2012). لازم به ذکر است که در تمامی این گزارش‌ها میزان

و نیترات سدیم (مرک، آلمان) خشک در آب دوبار تقطیر بدست آمد. محلول‌های رقیق‌تر از این‌ها ساخته شد. برای جلوگیری از رشد میکروب‌ها، چند قطره کلروفورم به آنها اضافه شده و در یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری با HPLC

دستگاه مورد استفاده در این تحقیق دستگاه HPLC با نشان Agilent مدل ۱۱۰۰ و مجهز به Diode Array Detector بود.

فاز حامل جهت اندازه‌گیری یون‌های نیتريت و نیترات شامل ۱۰ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات و ۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل می‌باشد که با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسیده و pH آن توسط متافسفريك اسید روی ۳ تنظیم شد. سرعت جریان فاز حامل از روی ستون یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. ستون مورد استفاده ستون تعویض آنیونی، AS4 با طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ذرات ۴ میلی‌متر و مجهز به گارد AG4 با طول ۵ سانتی‌متر و قطر ذرات ۴ میلی‌متر بود.

برای ارزیابی میزان بازیابی نمونه‌ها و دقت آزمون، مقادیر متفاوتی از محلول‌های استاندارد نیتريت سدیم و نیترات سدیم به نمونه‌ها افزوده و سپس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

چندین غلظت استاندارد از نیتريت و نیترات سدیم (0.0125-15 mg/L) تهیه و به دستگاه تزریق شد. سپس منحنی زیر هر یک محاسبه و در برابر غلظت آنیون قرار داده شد تا ضریب همبستگی خط حاصله محاسبه گردد.

آزمون آماری

آزمایش‌ها به طور عمده در سه تکرار انجام شد و سپس میانگین و انحراف معیار بدست آمد. جهت مطالعه وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها، از

نگهداری شد. نمونه‌ها حاوی ۶۱ تا ۸۰ درصد گوشت بودند و طوری انتخاب شدند که تمامی آن‌ها چهار روز پس از تاریخ تولید مورد ارزیابی برای میزان باقی‌مانده نیتريت و نیترات قرار گیرند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

هر نمونه (حدود ۲۵۰ گرم) در دمای محیط و در آسیاب آزمایشگاهی کاملاً خرد و همگن شد و در ظرفی سربسته در یخچال با دمای ۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. حداکثر ۴ ساعت پس از آماده‌سازی اولیه نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱۰ گرم از نمونه خرد شده با ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ۷۰ درجه سلسیوس مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم در همین دما قرار داده شد. پس از سرد شدن مخلوط، به آن ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در شیکر با دور متوسط قرار گرفت. مخلوط به کمک کاغذ صافی واتمن به شماره ۴۲ صاف شد و به ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه صاف شده ۲ میلی‌لیتر محلول کارز I (۱۵ گرم پتاسیم هگزا سیانوفرات II در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲ میلی‌لیتر محلول کارز II (۲۲ گرم استات روی حاوی ۲ مولکول آب و ۳ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه گردید. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط ثابت نگه داشته شد و بعد از آن در ۳۵۰۰g سانترفیوژ شد. مایع رویی جدا شد و از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و ۲۰ میکرولیتر آن برای اندازه‌گیری میزان نیتريت و نیترات به سیستم HPLC تزریق شد.

محلول‌های استاندارد نیتريت سدیم (۱۰۰۰mg/L) و نیترات سدیم (۱۰۰۰mg/L) با حل کردن نیتريت سدیم

به ترتیب کمترین مقدار نیتريت سدیم باقی مانده در نمونه های سوسیس و کالباس ۲۴/۴ و ۱۵/۲۵ میلی گرم در کیلوگرم می باشد. بیشترین مقدار نیتريت سدیم باقی مانده در نمونه های سوسیس و کالباس به ترتیب ۴۹/۴۸ و ۲۵/۶۷ میلی گرم در کیلوگرم بدست آمد.

میزان متوسط نیتريت سدیم باقی مانده در نمونه های سوسیس و کالباس حاوی 61 تا ۸۰ درصد گوشت، چهار روز پس از تولید به ترتیب $124/85 \pm 5/3$ و $99/11 \pm 5/5$ میلی گرم در کیلوگرم بدست آمد که تفاوت معنی داری با هم دارند ($p < 0/05$). کمترین میزان نیتريت سدیم باقی مانده در نمونه های سوسیس و کالباس به ترتیب ۱۱۵/۳۷ و ۸۵/۸۱ میلی گرم در کیلوگرم بدست آمد در حالیکه بیشترین میزان نیتريت باقی مانده در نمونه های سوسیس و کالباس به ترتیب ۱۳۵/۷۶ و ۱۰۸/۱۴ میلی گرم در کیلوگرم بود (جدول شماره ۲).

آزمون T مستقل استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 صورت پذیرفت.

یافته ها

میزان بازیابی برای نیتريت سدیم و نیتريت سدیم به ترتیب ۹۴/۶-۱۰۱ و ۱۰۷-۱۰۲ درصد بدست آمد.

ضریب همبستگی (r^2) در سیستم مورد استفاده برای نیتريت سدیم ۰/۹۶۰ و برای نیتريت سدیم ۰/۹۹۴ بدست آمد.

همانطور که در جدول شماره یک مشاهده می کنید میزان متوسط نیتريت سدیم باقی مانده در نمونه های سوسیس $36/96 \pm 7/38$ mg/Kg و در نمونه های کالباس $20/97 \pm 3/28$ mg/Kg می باشد که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری دارند ($p < 0/05$).

جدول ۱- میزان نیتريت باقی مانده در نمونه های سوسیس و کالباس (بر اساس میلی گرم در کیلوگرم)

نمونه	میانگین \pm انحراف معیار	کمینه	بیشینه
سوسیس	$36/96 \pm 7/38$	۲۴/۴	۴۹/۴۸
کالباس	$20/97 \pm 3/28$	۱۵/۲۵	۲۵/۶۲

* نشان دهنده اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد.

جدول ۲- میزان نیتريت باقی مانده در نمونه های سوسیس و کالباس (بر اساس میلی گرم در کیلوگرم)

نمونه	میانگین \pm انحراف معیار	کمینه	بیشینه
سوسیس	$85/81 \pm 5/5$	۹۹/۱۱	۱۰۸/۱۴
کالباس	$124/85 \pm 5/3$	۱۱۵/۳۷	۱۳۵/۷۶

* نشان دهنده اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد.

می نماید، شدت رنگ ایجاد شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر سنجیده می شود (Ferriera and Silva, 2008). نیتريت به طور معمول به نیتريت احیاء می شود و به روش فوق سنجش می شود. عمدتاً از فلز کارمیوم برای احیاء نیتريت استفاده می شود که فلزی سمی است،

بحث و نتیجه گیری

روش متداول اندازه گیری نیتريت و یا نیتريت در غذا، بر پایه توانایی نیتريت در تبدیل آمین های آروماتیک به یون های دیازونیوم می باشد که این ترکیب با یک ترکیب آروماتیک دیگر متصل شده و تولید رنگ آزو را

خطرناکی همچون نیتروز آمین‌ها گردد. میزان نیتروز آمین تولید شده به مقدار نیتريت یا نیترات افزوده شده به محصول و همچنین باقی‌مانده این ترکیبات در فرآورده گوشتی بستگی دارد. (Pegg and Shahidi, 2000).

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان نیتريت باقی‌مانده موجود در فرآورده‌های گوشتی امولسیونه (۶۱ تا ۸۰ درصد گوشت) در سطح عرضه در شیراز چهار روز پس از تولید از حداکثر میزان مجاز تدوین شده توسط سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران کمتر می‌باشد. در ایران حداکثر میزان نیتريت سدیم باقی‌مانده در روز چهارم پس از تولید در سوسیس و کالباس‌های حاوی ۶۰ درصد گوشت و بیشتر، ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در نظر گرفته شده است.

اما نیتريت یک ترکیب بسیار واکنش‌گر است و پس از افزودن آن به خمیر سوسیس درگیر یک‌سری از واکنش‌های شیمیایی می‌شود و به مرور زمان میزان آن کاهش می‌یابد. بیشترین میزان کاهش نیتريت در حین فرآوری اتفاق می‌افتد و تا پایان فرآیند حرارتی ادامه می‌یابد. بسته به میزان نیتريت افزوده شده و مقدار گوشت محصول، پس از پخت ممکن است تا ۶۵ درصد میزان نیتريت افزوده شده کاهش پیدا کند (Perez-Rodriguez et al., 1996).

در این پژوهش میزان توسط نیتريت باقی‌مانده در کالباس‌ها و سوسیس‌های حاوی ۶۱ تا ۸۰ درصد گوشت قرمز چهار روز پس از تولید به ترتیب به ۲۰/۹۷ و ۳۶/۹۶ میلی‌گرم در کیلوگرم رسید. از مهمترین واکنش‌هایی که نیتريت در آنها شرکت کرده و میزان آن به مرور کاهش می‌یابد می‌توان به واکنش نیتريت با

به علاوه این روش وقت‌گیر و طولانی است و فاکتورهای مختلفی می‌توانند در نتایج آزمون تداخل ایجاد نمایند (Rincon et al., 2003).

استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا روشی سریع، حساس، اختصاصی و دقیق می‌باشد که نتایج قابل اعتمادی به دست می‌دهد (Ferreira and Silva, 2009). در این مطالعه، نیتريت و نیترات سوسیس و کالباس‌های پخته با آب گرم استخراج شد و پس از رسوب دادن پروتئین‌های نمونه، از محلول صاف شده برای تزریق به HPLC استفاده شد. کل زمان لازم برای انجام آزمون و بدست آوردن پاسخ کمتر از ۲ ساعت می‌باشد. میزان بازیابی نیتريت و نیترات افزوده شده به نمونه‌ها در حد قابل قبولی می‌باشد که با نتایج به دست آمده توسط Ozkein و همکاران در سال ۲۰۰۲ هم‌خوانی زیادی دارد.

ضریب همبستگی (r^2) بین غلظت نمونه‌ها و سطح منحنی زیر قله‌ها نشان دهنده دقت آزمون در محدوده ۰/۱۲۵ تا ۱۵ میلی‌گرم نیتريت و نیترات سدیم در هر کیلوگرم از نمونه می‌باشد. در موارد لزوم نمونه‌ها قبل از تزریق رقیق سازی شد.

در مجموع کاربرد HPLC برای اندازه‌گیری باقی‌مانده نیتريت و نیترات در فرآورده‌های گوشتی در آزمایشگاه‌هایی که امکان استفاده از این دستگاه را داشته باشند توصیه می‌شود. این روش، روشی سریع و دقیق است که امکان اندازه‌گیری همزمان نیتريت و نیترات را در نمونه‌ها فراهم می‌کند.

نیتريت و نیترات یکی از کلیدی‌ترین ترکیبات در عمل‌آوری گوشت محسوب می‌شوند، اما افزودن آنها به فرآورده‌های گوشتی ممکن است سبب تولید مواد

استفاده از آسکوربات سدیم می‌باشد (Sen and Baddoo, 1977).

Kamkar و همکاران در سال ۲۰۰۴ به مطالعه میزان نیتريت باقی‌مانده در فرآورده‌های گوشتی عرضه شده در تهران پرداختند. بر اساس گزارش آنها میزان متوسط نیتريت در سوسیس و کالباس‌های عرضه شده به ترتیب برابر با ۲۳/۰۵ و ۲۰/۸۳ میلی‌گرم در کیلوگرم بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین عنوان شد که در این ارزیابی ۷/۷ درصد نمونه حاوی مقادیر بیش از حد مجاز نیتريت بوده‌اند.

یک سال بعد و در تحقیقی دیگر، Kamkar و همکاران (۲۰۰۴b) میزان نیتريت باقی‌مانده در سوسیس‌های گوشت قرمز عرضه شده در بازار ایران را $27/5 \pm 1/91$ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش کردند که به طور معنی‌داری از میزان آن در کالباس‌های گوشت قرمز عرضه شده $18 \pm 1/5$ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیشتر بود. در این بررسی ۴/۴ درصد نمونه حاوی مقادیر بیش از حد مجاز نیتريت (۶۰ ppm) گزارش شدند.

نتایج حاصل از این بررسی در مقایسه با دیگر بررسی‌هایی که در سال‌های گذشته در ایران به انجام رسیده نشان‌گر مقادیر کمتر نیتريت باقی‌مانده در فرآورده‌های گوشتی امولسیونه می‌باشد.

در این مطالعه میزان متوسط نیتريت باقی‌مانده در سوسیس و کالباس‌های حاوی ۶۱ تا ۸۰ درصد گوشت قرمز در چهار روز پس از تولید به ترتیب $85/81 \pm 5/5$ و $124/85 \pm 5/3$ میلی‌گرم در کیلوگرم بدست آمد.

Babaei و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تنها گزارش موجود از میزان نیتريت در فرآورده‌های گوشتی ایران، میزان متوسط نیتريت در سوسیس و کالباس را به ترتیب

ترکیبات حاوی هم، تبدیل شدن به نیتريت، تولید گازهایی همچون ازت، دی‌اکسید ازت، و نیتريك اکساید، واکنش با پروتئین‌های غیرهم، واکنش با بافت‌های چربی و تولید نیتروز آمین‌ها اشاره کرد (Pegg and Shahidi, 2000).

همانطور که مشاهده می‌شود میزان کاهش نیتريت در سوسیس‌ها (با قطر کمتر) کمتر از نمونه‌های کالباس (با قطر بیشتر) می‌باشد. طول مدت پخت کالباس در کارخانه به طور متوسط ۶-۵ ساعت است و از مدت زمان ۲-۱ ساعته لازم برای پخت سوسیس بیشتر است. فرآیند پخت می‌تواند اثر قابل توجهی بر کاهش نیتريت افزوده شده داشته باشد. Yaghoobifar و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹، در مطالعه‌ای بر روی سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در شهر سبزوار نشان دادند که میزان کاهش نیتريت سدیم در فرآورده‌های گوشتی امولسیونه با قطر کمتر (سوسیس) کمتر از فرآورده‌های قطورتر (کالباس) بوده است.

به دلیل حساسیت جامعه جهانی نسبت به مسئله نیتريت و باقی‌مانده آن در فرآورده‌های گوشتی، طی چند دهه گذشته تلاش‌های زیادی برای به حداقل رساندن میزان نیتريت و یا نیتريت افزودنی به فرآورده‌های گوشتی انجام شده است. Cassens در سال ۱۹۹۶ عنوان نمود که میزان نیتريت باقی‌مانده در فرآورده‌های گوشتی در ایالات متحده آمریکا از نیمه دهه ۱۹۷۰ میلادی به طور چشمگیری (نزدیک به ۸۰ درصد) کاهش یافته است. در خلال چند دهه گذشته، میزان نیتريت باقی‌مانده در فرآورده‌های گوشتی در کشور کانادا هم کاهش پیدا کرده است. مهم‌ترین دلیل برای این کاهش نیتريت باقی‌مانده، کاهش استفاده از نیتريت و نیتريت و افزایش

اندازه‌ای برسد که از این گیاهان برای عمل‌آوری غیرمستقیم فرآورده‌های گوشتی استفاده شود. این روش به عمل‌آوری طبیعی (Natural curing) معروف شده است (Sindelar et al., 2010). نشان داده شده است که بین ۱۰ تا ۳۰ ppm از نیترات باقی‌مانده در فرآورده‌های گوشتی از گوشت، آب و ادویه‌جات منشاء می‌گیرد (Perez-Rodriguez et al., 1996).

Mohler در سال ۱۹۷۱ مشخص کرد که حدود ۲۰ درصد نیتريت افزوده شده به گوشت گاو در دو ساعت ابتدایی فرآوری به نیترات تبدیل می‌شود. این تبدیل عمدتاً پیش از فرآیند حرارتی اتفاق می‌افتد و پس از حرارت دیدن محصول روند آن آهسته می‌شود. مشخص شده که افزودن آسکوربیک اسید نقش بسیار مهمی در تبدیل نیتريت به نیترات دارد.

نکته جالب توجه در این بررسی نسبت عکس میزان نیتريت و نیترات در سوسیس و کالباس‌های مورد آزمایش می‌باشد. به نظر می‌رسد هر چقدر میزان نیتريت فرآورده کاهش بیشتری پیدا می‌کند میزان نیترات بیشتری در آن تولید می‌شود.

در مجموع در این مطالعه از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای ارزیابی همزمان میزان نیتريت و نیترات باقی‌مانده در سوسیس و کالباس استفاده شده که نسبت به روش ارزیابی معمول این یون‌ها روشی سریع‌تر، حساس‌تر و دقیق‌تر محسوب می‌شود.

به علاوه نشان داده شد که روند استفاده از نیتريت به عنوان یک افزودنی اساسی در تهیه فرآورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده در ایران همانند بسیاری از کشورها روندی رو به کاهش است و مصرف‌کنندگان نباید از بابت این افزودنی در فرآورده‌های گوشتی ایران نگرانی

۸۱/۱۴ و ۱۱۵/۱ میلی گرم در کیلوگرم اعلام کرده‌اند که با نتایج این مطالعه نزدیکی بسیاری دارد. به علاوه در این گزارش میزان متوسط نیترات باقی‌مانده در همبرگر ۸۹/۸ میلی گرم در کیلوگرم گزارش شده است. همانطور که می‌دانیم در تهیه همبرگر از هیچ گونه افزودنی استفاده نمی‌شود و این میزان قابل توجه نیترات مربوط به مواد خام مورد استفاده در تهیه آن می‌باشد.

Reinik و همکاران در سال ۲۰۰۳ میلادی میزان متوسط نیترات باقی‌مانده در سوسیس‌های پخته کشور استونی را ۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش کردند که نسبت به مقدار آن در سال ۲۰۰۱ (۶۷mg/Kg) کاهش یافته بود.

یون نیترات ویژگی ایجاد سمیت حاد کمی دارد اما می‌تواند به نیتريت که از لحاظ بهداشتی ماده‌ای چالش برانگیز است تبدیل شود. احیاء نیترات به نیتريت می‌تواند در حضور فلزات، برخی از باکتری‌ها و یا آنزیم نیترات ردوکتاز اتفاق بیفتد.

میزان قابل قبول دریافت روزانه نیترات برای انسان در اتحادیه اروپایی ۳/۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عنوان شده است. از طرفی در برخی کشورهای جهان نیترات یک افزودنی در فرآورده‌های گوشتی محسوب می‌شود و میزان مجاز آن ۲۵۰ mg/Kg در نظر گرفته شده است (Ysart et al., 1999).

این واقعیت که می‌توان در فرآورده‌های گوشتی که به آنها نیترات اضافه نشده مقادیر قابل توجهی نیترات را پیدا کرد تعجب برانگیز نیست. منشأ اصلی نیترات در غذا از گیاهان است. به ویژه استفاده از کودهای نیتروژنه که برای حاصل‌خیزی خاک استفاده می‌شود. میزان نیترات در برخی از گیاهان و سبزیجات می‌تواند به

داشته باشند. میزان نیترات قابل توجهی در نمونه‌ها تشخیص داده شد که عمدتاً به مواد تشکیل دهنده می‌شود.

منابع

- بابایی، ز.، باقری، غ.، صالحی فر، ا.، جوادیان، ب. و کریم زاده، ل. (۱۳۹۰). اندازه‌گیری باقی‌مانده نیترات و نیتريت سدیم در فرآورده‌های گوشتی تولیدی بعضی از شهرهای استان مازندران در نیمه دوم سال ۱۳۸۷. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۱(۱): ۲۲۸-۲۳۳.
- کامکار، ا.، حسینی، ه.، علوی، س. و باهنر، ع. (۱۳۸۳). مطالعه میزان باقی‌مانده نیتريت در فرآورده‌های گوشتی عرضه شده در تهران در سال ۱۳۸۱. پژوهش و سازندگی، ۶۳: ۶۵-۶۰.
- کامکار، ا.، رکنی، ن.، چراغعلی، ع.، حسینی، ه.، رضایی مجاز، م.، بکایی، س.، نوروزیان، ا. و عبدالله زاده، ع. (۱۳۸۳). اندازه‌گیری میزان باقی‌مانده نیتريت در انواع فرآورده‌های گوشتی عرضه شده در ایران به روش اسپکتروفوتومتریک. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۹(۲): ۱۸۲-۱۷۹.
- ناصحی نیا، ح.، مهدی نیا، س.، قربانی، ر. و نوری سپهر، م. (۱۳۸۷). میزان نیتريت موجود در فرآورده‌های گوشتی سوسیس و کالباس توزیع شده در استان سمنان. پایش، ۳: ۲۰۲-۱۹۷.
- یعقوبی فر، م.، شاکری نژاد، ع. و اکبری، ا. (۱۳۸۸). مقایسه کیفیت و ایمنی محصولات سوسیس و کالباس عرضه شده در شهر سبزوار با استانداردها. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی سبزوار، ۱۶(۲): ۱۲۰-۱۱۴.

- Babaei, Z., Bagheri, G., Salehifar, E., Javadian, B. and Karimzadeh, L. (2012). Determination of residual nitrate and nitrite in meat products that were produced in some cities of Mazandaran province from autumn 2008 until winter 2009. *Journal of Mazandaran University of Medical Science*, 21(1): 228-233 [In Farsi].
- Cassenes, R.G. (1996). Residual nitrite in commercial cured meats in the USA: 1995. In book of abstracts. 1996 IFT annual Meeting. New Orleans, LA, pp.61.
- Ferriera, I.M.P.L.V.O and Silva, S. (2008). Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/diode array detector. *Talanta*, 74: 1598-1602.
- Forest, J.C., Aberle, E.D., Hedrick, H.B., Judge, M.D. and Merkel, R.A. (1975). *Principle of Meat Science*. San Francisco: Freeman.
- Honikel, K.O. (2008). The use and control of nitrite and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78: 68-76.
- Huang, Y.G., Ji, J.D. and Hou, Q.N. (1996). A study on carcinogenesis of endogenous nitrite and nitrosamine, and prevention of cancer. *Mutation Research*, 358: 7-14.
- Institute of standards and Industrial Research of Iran. (2010). *sausages—specifications and test methods*. Third Edition, ISIRI, No. 2303.
- Kamkar, A., Hoseiny, H., Alavy, S. and Bahonar A. (2004a). The study of nitrite residue in meat products consumed in Tehran in 2003. *Pajouhesh and Sozandegi*, 63: 60-65 [In Farsi].

- Kamkar, A., Rokny, N., Cheraghali, A., Hosieny, H., Bokaie, S., Rezaie Mojaz, M., Nowrouzian, I. and Abdollahzadeh, A. (2004b). Determination of nitrite residues in meat products marketed in Iran by spectrophotometric method. *Journal of Faculty of veterinary Medicine University of Tehran*, 59 (2): 179-182 [In Farsi].
- Mohler, K. (1971). Bilanz der bildung des pokel farbstoffs in Muskelfleisch. II. Mitleilung. Hitzekatalay sierte Bildung des stickoxidkomplexes. *Lebensm Unters Forsch*, 147: 123-127.
- Nasehinia, H.R., Mehdiana, S.M., Ghorbani, R. and Noorisepehr, M. (2008). Nitrite residues in sausages marketed in semnon province. *Payesh*, 7(3): 197-202 [In Farsi].
- Oztekin, N., Nutku, M.S. and Erim, F.B. (2002). Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 76: 103-106.
- Pegg, R.B and Shahidi, F. (2000). Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Trumbull, CT: Food & Nutrition Press. Inc.
- Perez-Rodriguez, M.L., Bosch-Bosch, N. and Garcia-Mata, M. (1996). Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. *Meat Science*: 44, 65-73.
- Reinik, M., Tamme, T., Rosto, M., Juhkam, K., Jurtsenko, S., Ten no, T. and Kis, A. (2005). Nitrites, Nitrates and N-nitrosamines in Estonian cured meat products: Intake by Estonian children and adolescents. *Food additives and contaminants*, 22(11): 1098-1105.
- Rincon, F., Martinez, B. and Delgado, M. (2003). Detection of factors influencing nitrate determination in meat. *Meat Science*: 65, 1421-1727.
- Sen, N.P. and baddoo, P.A. (1997). Trends in the level of residual nitrite in canadian cured meat products over the past 25 years. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 45: 4714-4718.
- Sindelar, J.J., Terns, M.J., Myen, E. and Boles, J.A. (2010). Development of a method to manufacture uncured, no-nitrate/nitrite-added whole muscle jerky. *Meat Science*, 86(2): 298-303.
- Usart, G., Miller, P., Barrett, G., Farrington, D., Lawrance, P. and Harrison, N. (1999). Dietary exposure to nitrate in the UK. *Food additives and contaminants*, 6(12): 521-532.
- Yaghubifar, M.A., Shakernejad, A. and Akaberi, A. (2009). Comparison of the Quality and Safety of Sausage and Salami with Standards in Sabzevar Iran. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 16(2): 114-120 [In Farsi].

Simultaneous determination of nitrite and nitrate residues in meat products marketed in Shiraz by high performance liquid chromatography

Golkari, H.¹, Eskandari, M.H.^{2*}, Pakfetrat, S.³, Lashkari, H.⁴

1- Instructor of Food Science and Technology Department, Darab branch, Islamic Azad university, Darab, Iran.

2- Assistant Professor of Food Science and Technology Department, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3- Master in Food Science, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

4- Instructor of Food Science and Technology Department, Zarrin Dasht branch, Islamic Azad university, Zarrin Dasht, Iran.

*Corresponding author email: eskandar@shirazu.ac.ir

(Received: 2012/8/25 Accepted: 2012/12/31)

Abstract

Nitrite and nitrate are the key ingredients and play a multifunctional role in meat curing technology. Despite all of their desirable effects, the addition of nitrite to meat is the major cause of carcinogenic N-nitrosamines formation. In this study, the amount of residual nitrite and nitrate in meat products containing 61% to 80% meat were assessed. The samples were obtained at the fourth day of their production from Shiraz retails and analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). According to the results, the mean concentrations of residual nitrite and nitrate were estimated at 36.96 ± 7.38 and 85.81 ± 5.5 mg/kg in small-diameter (1.5-2 cm) sausages. Meanwhile, in large-diameter (5.5-8 cm) sausages the residues were estimated at 20.97 ± 3.28 and 124.85 ± 5.3 mg/kg, respectively. In all analyzed samples, the residual nitrite level was found below the permitted level of 120 mg/kg which indicated the application of allowed concentrations of nitrite in such products. The mean values of residual nitrite and nitrate concentrations were statistically different ($p < 0.05$) between small and large-diameter sausages. Although nitrate was not used in these products, detection of relatively high levels of nitrate could be originated from the ingredients of sausages such as meat, water, spices as well as vegetable or might be entered via the conversion of nitrite to nitrate during the primary stages of processing. Finally, it was concluded that HPLC is a rapid, sensitive and selective method and provides accurate results.

Keywords: Nitrite, Nitrate, Residue, Meat products, HPLC.